

Systématique et biologie

POLYMORPHISME DES ESTÉRASES DE *DIPRION PINI* L. (HYMENOPTERA, SYMPHYTA, DIPRIONIDAE) AU COURS DE SON DÉVELOPPEMENT

par

L. BEAUDOIN (1) et J.-P. ALLAIS (2)

Les estérases de *Diprion pini* L. ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide depuis les premiers stades larvaires jusqu'aux stades imaginaux. Nous avons mis en évidence quatre systèmes enzymatiques qui se retrouvent à tous les stades : l'estérase A diallélique, l'estérase A' qui pourrait coder pour un allèle nul et les estérases B et C trialléliques. Les estérases A, A' et C seraient des α estérases alors que les B seraient des β estérases. Deux estérases E et F (β estérases) sont caractéristiques des larves : la première, diallélique, subsiste chez l'éonymphe libre et pourrait être liée à l'activité locomotrice des insectes alors que la deuxième, monoallélique, qui n'est présente que chez les larves qui se nourrissent, serait liée à la nutrition des individus. La septième estérase qui manifeste une très grande activité enzymatique est caractéristique de la glande cémentaire de la femelle adulte.

Esterases polymorphism of *Diprion pini* L. (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae) during development

The esterases of *Diprion pini* L. were analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis from the first larvae to adult stadium. We find four enzymatic systems at all the stadiums : a diallelic esterase A, an esterase A' which could be code for a null allele and triallelics esterases B and C. The esterases A, A' and C would be α -esterases whereas B, β -esterases. Two esterases E and F (β -esterases) are characteristic of larvae : the first, diallelic subsists in free eonymph and could be related to locomotion activity whereas the second, monoallelic, which only exists in feeding larvae, could be related to feeding. A seventh esterase which show a very large enzymatic activity is the feature of the adult female cementary gland.

Estérases de *Diprion pini* (Hymenoptera)

Introduction

Au cours de l'étude que nous avons entreprise sur le polymorphisme enzymatique des populations naturelles de *Diprion pini* L., nous avons été amenés à étudier les estérases. Les estérases non spécifiques représentent en effet un groupe d'enzymes susceptibles de réagir avec des esters de synthèse (GOMORI, 1952). Ces enzymes existent dans tous les tissus et présentent le plus souvent, qu'il s'agisse des animaux ou des végétaux, un important polymorphisme. Comme leur activité est susceptible de varier chez les Insectes au cours du développement, ce qui a bien été démontré chez *Culex pipiens* L. (PASTEUR, 1977), nous les avons analysés au cours du cycle biologique de *Diprion pini*. Ce sont les résultats de cette étude que nous présentons ci-dessous.

Cycle biologique de *Diprion pini*

Diprion pini L. (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae) est un insecte inféodé dans nos régions au pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.). Les larves de cet insecte se nourrissent des aiguilles de ce conifère et peuvent causer, lors de pullulations, des défeuillaisons spectaculaires à l'intérieur des massifs forestiers.

Diprion pini L. vit aussi bien en plaine qu'en montagne (1600m) : en plaine, cet insecte présente deux générations par an, la première évoluant d'avril à juillet, la seconde d'août à fin septembre, donnant des éonymphes qui, après être entrées en diapause, sont à l'origine de la génération d'avril suivante. En montagne, il n'existe qu'une seule génération évoluant en juillet-août et donnant des éonymphes qui, après une diapause hivernale, donnent naissance à la génération de l'année suivante. Soulignons que dans les deux cas, les phénomènes de diapause peuvent être très complexes et, qu'il s'agisse des populations de plaine ou de montagne, ces insectes peuvent subir une diapause qui peut durer de quelques mois à un an, deux ans, trois ans (GERI, 1988).

Les oeufs sont pondus par la femelle dans les aiguilles âgées d'un an, situées à l'extrémité des rameaux des pins et recouverts d'une substance spumeuse qui durcit au contact de l'air (CEBALLOS & ZARCO, 1952). Après éclosion, les larves (cinq stades chez le mâle, six chez la femelle, identifiables par la taille de la capsule céphalique) issues d'une même ponte restent groupées et consomment les aiguilles du rameau de ponte. Au deuxième stade, les larves groupées migrent vers les rameaux voisins. A partir du cinquième stade et en fonction du feuillage disponible, on observe des déplacements plus importants des larves qui ont tendance à ne pas rester groupées. A la fin du cinquième stade larvaire (mâle) ou du sixième (femelle), les larves cessent de s'alimenter et se dispersent ; cette dispersion précède le tissage du cocon et a pour conséquence une dissémination des individus sur la strate herbacée ou arbustive plus ou moins proche de l'arbre hôte. Au cours de ce cheminement, les larves subissent la mue éonymphale ; les éonymphes, encore mobiles (éonymphes libres) sont reconnaissables à leur capsule céphalique blanche. Après immobilisation, elles tissent un cocon sur un support qui peut être varié : anfractuosités d'écorces, aiguilles de pin, litière végétale, graminées... Les cocons, de forme cylindrique, sont plus grands chez la femelle que chez le mâle (le développement larvaire dure de 30 à 45 jours). Un à deux jours après le tissage du cocon (ELIESCU, 1932), l'éonymphe subit un recroquevillement au cours duquel on observe la régression des fausses pattes abdominales ("éonymphe vraie" suivant VASIC *et al.*, 1955). Celle-ci, soit se développe directement, soit subit une diapause plus ou moins longue (EICHHORN, 1979 ; GERI, 1988). Dans le cas d'un développement direct (ou d'une reprise de développement après diapause), l'éonymphe se transforme en pronymphe, caractérisée par l'apparition des ébauches oculaires et un nouveau

Bulletin de la Société Zoologique de France 116 (3-4)

raccourcissement du corps (3-4 jours). En fin d'évolution, la pronympe se transforme en nymphe avec apparition des yeux et régression des appendices thoraciques (6-12 jours). Après durcissement du tégument (1-7 jours), l'adulte sort du cocon en en découpant l'une des extrémités. Les imagos, qui survivent entre 7 et 16 jours, ne s'alimentent pas et sont sexuellement mûrs, les mâles émergeant en général un peu avant les femelles. Les adultes ne s'accouplent qu'une fois (ELIESCU, 1932). Après l'accouplement, les femelles gagnent un rameau de pin bien fourni en aiguilles pour pondre. Rappelons que les *Diprions* étant des Hyménoptères, les oeufs non fécondés donnent des mâles haploïdes.

Matériel et méthodes

Les insectes que nous avons utilisés ont été prélevés aux différents stades de leur développement dans des élevages permanents entretenus au laboratoire depuis 17 générations à partir de souches récoltées en Sologne (Sennely) (GOUSSARD & GERI, 1989).

Nous avons prélevé les premiers stades larvaires L1, L2, L3, L4 et L5 (reconnaissables grâce à la capsule céphalique) sans qu'il soit possible de distinguer leur sexe. Les analyses portant sur les derniers stades larvaires L6 jusqu'au stade adulte ont été effectuées en tenant compte du sexe des individus.

L'observation et le prélèvement des différents stades nymphaux ont pu être faits en transférant les "éonymphes vraies" de leur cocon dans des capsules en plastique transparent de même taille permettant la visualisation des individus.

Les insectes ainsi prélevés sont stockés séparément dans des microtubes à -20°C. Chaque individu est broyé à +4°C avec un microbroyeur de Potter Eppendorf en présence de 200 à 400 µl de Tampon Phosphate 0,2 M, pH 7,4 (10% de saccharose et 10-5% de mercaptoéthanol) et une goutte de polyéthylèneglycol. Après centrifugation (~ 12100 g, +4°C, 25 minutes), le surnageant est prélevé et stocké à -20°C jusqu'à son analyse par électrophorèse.

Les électrophorèses des extraits sont effectuées sur plaque verticale de gel à 8,5% de polyacrylamide (L.K.B.) dans un appareil Pharmacia (G.E.-2/4 LS) réfrigéré à +4°C. Les migrations (de la cathode vers l'anode) sont effectuées sous une tension de 400 V (durée 2 heures).

Les gels sont incubés 3 à 4 minutes à température ambiante dans une solution comprenant 200 mg d' α -naphthyl acétate et 150 mg de β -naphthyl acétate dissout dans un mélange de 40 ml d'acétone et de 60 ml de Tampon Tris HCl 0,1 M pH 7,4. Après lavage des gels à l'eau, les α et les β estérases sont révélées par une solution à 2% de "Fast Blue RR salt" dans un Tampon Tris HCl 0,1 M pH 7,4. Après apparition des bandes (noires pour les α -estérases, rouges pour les β -estérases), les gels, après lavage à l'eau, sont fixés dans une solution d'acide acétique à 10%.

L'activité cholinestérasique a été étudiée en utilisant l'ésérine à la concentration de 10^{-3} M. Rappelons que l'ésérine inhibe les cholinestérases.

Résultats et discussion

L'analyse des estérases de *Diprion pini* L. effectuée à différentes périodes de son développement montre que cet insecte présente une assez grande homogénéité de son équipement estérasique (cf. figure 1). Pour simplifier, nous pouvons dire qu'à tout moment de son cycle biologique, *Diprion pini* L. présente au moins quatre zones enzymatiques ayant une activité α ou β estérasique. Dans tous les cas, ces estérases sont monomériques car si les femelles homozygotes ou les mâles, pour une zone donnée, ne présentent qu'une seule bande, les

Estérase de *Diprion pini* (Hymenoptera)

hétérozygotes en présentent deux. En partant de la zone de plus faible mobilité électrophorétique vers la zone de plus forte mobilité, nous distinguons : une estérase A diallélique, une estérase A' qui semble être codée par un allèle nul (soit elle est représentée par une seule bande, soit elle n'apparaît pas), une estérase B triallélique et une estérase C triallélique.

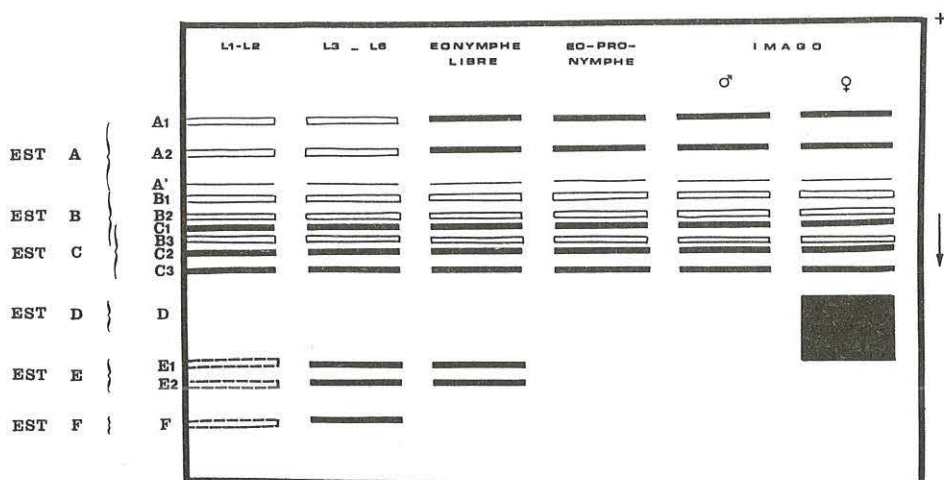


Figure 1

Evolution du zymogramme des estérases de *Diprion pini* L. au cours de son développement.

Pour chaque stade sont représentés tous les allèles possibles trouvés.

En blanc, les isoenzymes spécifiques du β -naphthyl acétate, substrat qui tend à révéler les estérases en rouge ; en noir, ceux spécifiques à l' α -naphthyl acétate, substrat qui tend à les révéler en noir.

Quand on observe ces estérases aux différentes périodes du développement, on s'aperçoit qu'elles n'apparaissent pas avec la même intensité respective d'un stade à l'autre. Ainsi, par exemple, il apparaît que l'intensité des bandes observées avec les individus L1 ou L2 soient beaucoup plus faible que celles observées pour les autres stades. Cette différence peut être due aussi bien aux conditions expérimentales (plus grande dilution des extraits du fait de la petitesse de la taille des échantillons) qu'à la physiologie même de l'animal (plus les larves sont âgées et plus elles présentent une grande activité de nutrition et de locomotion).

Dans tous les cas, ce sont les estérases B qui montrent une plus grande activité enzymatique, puis viennent par ordre décroissant les estérases C puis les estérases A et A'.

Bulletin de la Société Zoologique de France 116 (3-4)

Il existe cependant deux grandes différences entre les adultes et les larves. Dans les extraits de ces dernières, nous avons décelé des estérases à haute mobilité électrophorétique colorées en rouge par notre système de révélation : il s'agit des estérases E dialléliques et F monoalléliques. Ces estérases sont bien visibles chez les larves L4, L5 et L6 ; nous n'avons pas pu les mettre en évidence avec les larves L1 et L2 (artéfact dû peut-être à la dilution trop grande des extraits) et elles présentent une faible activité chez les larves L3.

Au moment où ces insectes arrêtent de se nourrir, on s'aperçoit que l'estérase F disparaît alors que l'estérase E subsiste encore chez l'éonymphe libre et qu'elle disparaît après tissage du cocon chez l'"éonymphe vraie" qui n'est plus mobile.

Tout semble indiquer que ces estérases E et F sont liées directement à l'activité physiologique de l'animal (elles ne sont pas inhibées par l'ésérine), la première à la locomotion, la seconde à la nutrition. Rappelons que les adultes ne se nourrissent plus.

L'autre grande différence observée chez les adultes ne concerne que les femelles qui présentent une estérase D intense dont la mobilité électrophorétique est intermédiaire entre les estérases C et E. Cette estérase est la seule à ne pas être inhibée par l'ésérine chez l'imago (ce qui indique qu'elle n'est pas liée à une activité cholinestérasique). Cet enzyme a tendance à surcharger le gel par sa présence et à occulter la révélation des allèles les plus mobiles des estérases B et C, ce qui explique pourquoi DUENZI *et al.* (1986), dans leurs études sur différents *Neodiprion* et *Diprion similis* avaient pris la précaution d'enlever l'abdomen afin de ne pas surcharger leur gel. STEINHAEUER (1979), a avancé que cette activité estérasique intense serait le témoin de la maturation sexuelle des imagos femelles et la manifestation des oeufs contenus dans l'abdomen.

Pour rechercher l'origine de cette estérase D, nous avons analysé les estérases de la tête, du thorax et de l'abdomen chez les imagos femelles. Cet enzyme est absent dans les extraits de tête et de thorax et a bien son origine dans l'abdomen. Si nous analysons les ovocytes présents dans la glande génitale, ceux-ci ne présentent aucune activité correspondant à l'estérase D. Par contre, si nous prélevons la glande annexe, dite glande cémentaire, décrite par ELIESCU (1932), responsable des sécrétions spumeuses déposées par la femelle lors de la ponte et que nous en faisons l'analyse, nous nous apercevons qu'elle présente une très grande activité estérase D (l'abdomen seul sans les ovocytes et sans cette glande ne présente pas cette activité).

Conclusions

Sept estérases ont pu être décrites chez *Diprion pini* L. au cours de son cycle biologique. Quatre de ces estérases (A, A', B et C) sont présentes à tous les stades. L'estérase A est diallélique, les estérases B et C trialléliques, l'estérase A' pourrait exister sous forme d'un allèle nul. Parmi ces quatre estérases, trois (A, A' et C) seraient des α -estérases alors que la B serait une β -estérase. Deux β -estérases supplémentaires, à plus grande mobilité électrophorétique, seraient présentes chez les larves, en relation avec leur activité de nutrition (estérase F) et de locomotion (estérase E). La dernière estérase mise en évidence, l'estérase D, est caractéristique de la glande cémentaire que l'on trouve chez les femelles adultes.

(1) Station de Zoologie forestière. INRA. Ardon, 45160 Olivet.

(2) Laboratoire de Zoologie et Ecologie. Centre d'Orsay, 91405 Orsay.

Estérases de *Diprion pini* (Hymenoptera)

REFERENCES

- CEBALLOS, G. & ZARCO, E. (1952).- Ensayo de lucha biológica contra una plaga de *Diprion pini* L. en masas de *Pinus sylvestris* L. de la Sierra de Albarracín. Instit. Esp. Entom. Madrid, 38 p.
- EICHHORN, O. (1979).- Autökologische Untersuchungen an Populationen der gemeinen Kiefern Buschhornblattwespe *Diprion pini* L. (Hym. Diprionidae). IV - Generations und Schlüpfwellenfolge. *Z. Angew. Entomol.*, **88**, 378-398.
- ELIESCU, G. (1932).- Breităge zur Kenntnis der Morphologie, Anatomie und Biologie von *Lophyrus pini* L. teil I-II. *Zeit. f. Angew. Entomol.*, **19**, 22-67 et 188-206.
- GERI, C. (1988).- The pine sawfly in Central France In : Forest insects Populations dynamics. Plenum Berryman New York and London, 377-405.
- GOMORI, G. (1952).- Microscopic histochemistry. The University of Chicago Press.
- GOUSSARD, F. & GERI, C. (1989).- Mise au point d'un élevage permanent de *Diprion pini* L. (Hym. Diprionidae) en laboratoire. *Agronomie*, **9**, 911-918.
- KUENZI, F.M. & COPPEL, H.C. (1986).- Isozymes of the sawflies *Neodiprion* and *Diprion similis* : Diagnostic characters and Genetic distance. *Biochemical systematics and ecology*, **14** (4), 423-429.
- PASTEUR, N. (1977).- Recherches de génétique chez *Culex pipiens pipiens* L. Polymorphisme enzymatique, autogénèse. Doctorat d'Etat, Université Montpellier II, 163 p.
- STEINHAEUER, A. (1979).- Versuche zur analyse der vererbung von peroxidase-isoenzymmustern der Doublasie, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, Anhand von vegetativem material : nadeln und somatischen calluskulturen. Inaugural-Dissertation, 141 p.
- VASIC, K. & SISOJEVIC, P. (1955).- Les insectes parasites de *Diprion pini* L. et leur action durant l'invasion de l'espèce en 1951-1952 dans la montagne de Maljen (Serbie occidentale). *Plant Protection (Beograd)*, **27**, 3-40.

(reçu le 31/08/90 ; accepté le 18/09/90).